

На правах рукописи

Абдельрахман

АТЕФ АБДЕЛЬМОХСЕН АБДЕЛЬРАХМАН АХМЕД

**ВЛИЯНИЕ *TRICHODERMA* ПОЧВ ЕГИПТА И РЕСПУБЛИКИ
ТАТАРСТАН НА ОТДЕЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ЖИВЫХ СИСТЕМ**

03.01.04. – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2011

Работа выполнена на кафедре биохимии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Алимова Фарида Кашифовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Багаева Татьяна Вадимовна,


доктор биологических наук, профессор
Умаров Марат Мутагарович

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики
КИББ НЦ РАН

Защита диссертации состоится «22» декабря 2011 года в 13 часов на заседании
Диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском (Приволжском)
федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18,
аудитория 211.
Факс 8(843)238-76-01, E-mail: atefnagi2000@yahoo.com,

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И.
Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета

Автореферат разослан « _ » ноября 2011 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук  З.И. Абрамова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Грибы рода *Trichoderma* являются продуцентами метаболитов с высокой антибиотической активностью в отношении грибов и бактерий. Показана способность к выделению различных фитогормонов, органических кислот, аминокислот, витаминов и свыше 100 антибиотиков (Benitez *et al.*, 2004, 2008; Druzhinina *et al.*, 2011). Изоляты рода *Trichoderma* являются активными продуцентами гидролаз и способны к глубокой деструкции, как клеточных стенок растений, так и отдельных трудно расщепляемых растительных полисахаридов: целлюлозы, гемицеллюлозы, пектина до мономерных форм и других полимеров (Claus, 2004; Harman *et al.*, 2004; 2010; Harman, 2011).

Как известно, *Trichoderma* может продуцировать ряд микотоксинов: аламетицины, хризопанол, эмодин, эргоконин, глиотоксин, глиовирин, G-белки, харзианум А, гептелидовую кислоту, изоцианоциклопентены, конингинины А, В, С, G, арацельзин, сатурниспорин, сузукациллин, триходермин, трихорзианины А и В, трихотецены, трихотоксины, триховиридин и виридин (Uraguchi, Yamazaki, 1978; Anthony *et al.*, 2009; 2010; Drizhinina *et al.*, 2011). Выявлены виды *Trichoderma*, продуцирующие токсичные метаболиты, приводящие к летальному исходу мышей (Anthony *et al.*, 2010). С другой стороны выделены новые вещества – циклотетрапептид и триходермине А, продуцируемые *T.reesei* обнаружили цитотоксическим эффектом против линии клеток человеческой меланомы A375-S2 (Sun *et al.*, 2006).

Таким образом, в литературе по сельскохозяйственной и в меньшей степени медицинской биохимии накоплен обширный материал по влиянию метаболитов *Trichoderma* на микроорганизмы, растения, теплокровные организмы, возбудителей заболеваний, раковые клетки. Практически нет материала по влиянию на комплекс биохимических показателей на теплокровных животных.

По ГОСТу, принятому в России биопрепараты проверяются на онкогенность, генотоксичность, вирулентность, фитопатогены, растения и целый ряд других биологических параметров.

Вследствие этого каждый биопрепарат должен проходить такую же длительную проверку экологической безопасности, как и химические препараты.

В последние 30 лет биопрепараты на основе *Trichoderma* являются одним из наиболее востребованных в Республике Татарстан. Однако спектр областей возможного применения метаболитов этого вида неуклонно расширяется и это требует дополнительных исследований.

Цель работы: Оценка биобезопасности и биологической активности метаболитов грибов рода *Trichoderma* из почв Египта и РТ к растениям, микроорганизмам, клеткам и животным.

Основные задачи исследования:

1. Охарактеризовать тип взаимодействия *T. asperellum* 551 из РТ и *T.harzianum* 3 из Египта с микромицетами рода *Fusarium*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus awamori*.
2. Определить влияние микромицетов рода *Trichoderma* на токсинообразование *Aspergillus flavus*.
3. Выявить эффективность действия фармацевтического фунгицида амфотерицина и метаболитов *Trichoderma* на некоторые физиологические параметры модельного вида *Aspergillus awamori*.
4. Оценить влияние метаболитов *Trichoderma* на жизнеспособность клеток линии HeLa.
5. Исследовать биохимические, гематологические, гистологические, иммунологические показатели мышей стока CD-1 на фоне метаболитов *Trichoderma* и индуктора опухолеобразования пирена.
6. Показать влияние метаболитов *Trichoderma* на рост и продуктивность некоторых сортов кукурузы.

Научная новизна. Впервые проведено сравнение влияния метаболитов *Trichoderma asperellum* 551 и *Trichoderma harzianum* 3 на рост и продуктивность районированных сортов кукурузы РТ и Египта на различных типах почв.

Впервые показано, что метаболиты *Trichoderma asperellum* 551 и *Trichoderma harzianum* 3 не обладают онкогенным действием и подавляют образование опухолей, индуцированных пиреном.

Метаболиты *Trichoderma asperellum* 551 и *Trichoderma harzianum* 3 оказывают антагонистическое действие на патогенные грибы и регулируют синтез охратоксина А и афлотоксина *A. flavus*.

Практическая значимость. Полученные результаты могут способствовать решению вопросов, связанных с организацией контроля и применения биофунгицидов и могут быть использованы для дальнейшей сертификации биопрепаратов на основе исследуемых штаммов *T.asperellum* 551 на базе биозавода ООО НПИ Биопрепараты в РТ, а на основе *T.harzianum* 3 на биозаводе в Египте.

Разнонаправленное действие метаболитов *Trichoderma* на токсинообразование *A. flavus* указывает на необходимость введения нового пункта контроля биопрепаратов на основе микромицетов.

Результаты могут быть использованы в учебном процессе в рамках дисциплин «Биотехнология», «Биологически активные вещества микробного происхождения».

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование. Работа выполнена в соответствии с тематическим планом КФУ "Выявление взаимосвязи сукцессий живых организмов и эволюционных изменений биосферы" раздел № 1 Темплана КФУ на период с 1.01.2011 по 31.12.2013 г. Девиз – РНП-23.Гранты РФФИ 11-04-00805-а «Микробные

сообщества почв древних ландшафтов лесостепи Поволжья» 2011-2013, 11-04-01731-а «Влияние тяжелых металлов на экологическое состояние почв при синергетическом эффекте загрязнения антропогенных ландшафтов 2011–2012». Все эксперименты проводились в лаборатории сельскохозяйственной биохимии и биотехнологии, кафедры биохимии, биолого-почвенного факультета Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань. Полевые испытания проводились на серой лесной почве Лаишевского района 2008 году и черноземе Черемшанского района в 2009 году РТ. Личное участие заключалось в разработке темы исследований, выборе объектов для изучения, проведении экспериментов, обработке полученных результатов, их анализ и интерпретация, подготовка статей к публикации (написание и редактирование), а также их обсуждение с рецензентами. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора. Масс – спектроскопию проводили в лаборатории к.ф.-м.н.я. Волошина А.В., отдела аналитической спектроскопии Федерального центра коллективного пользования физико - химических исследований веществ и материалов Приволжского федерального округа. Получены положительные отзывы от предприятий по предварительным опытам использования опытных партий биопрепаратов на основе штаммов *Trichoderma* в сельскохозяйственной биотехнологии РТ.

Положения, выносимые на защиту.

1. Метаболиты грибов рода *Trichoderma*, выделенные из почв Египта и РТ, оказывают разнонаправленное действие на выработку охратоксина А и афлатоксина В1 патогеном *A. flavus* в зависимости от вида микромицета.
2. Метаболиты *T.asperellum* 551 ингибируют индуцированное пиреном образование опухолей в печени и коже у мышей и оказывают цитотоксическое действие на клетки HeLa в опытах *in vitro*.
3. Наибольшую антагонистическую активность в отношении фитопатогена рода *Fusarium oxysporum* оказывает миромикет, выделенный из почв Республики Татарстан

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих конференциях:

1. «Становление и достижения биохимической школы казанского университета» (Казань, КФУ, ноябрь 2009),
2. «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, МГУ, декабрь 2009),
3. Ежегодная конференция Казанского федерального университета (Казань, КФУ, февраль 2010),
4. «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий», I научно-практическая интернет-конференция (ноябрь 2010),
5. Ежегодная конференция Казанского федерального университета (Казань, КФУ, февраль 2011),

6. «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий», II научно-практическая интернет-конференция (Казань, КФУ, ноябрь 2011),

7. «Международная конференция» по вопросам сельского хозяйства и ирригации в странах бассейна Нила», (факультет сельского хозяйства, Университет Минья, г.Эль-Минья, Египет, 26-29 марта, 2012).

Публикации. По данной теме опубликовано 8 работ в сборниках международных и всероссийских конференций, опубликованы 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Основное содержание работы изложено на 175 страницах машинописного текста, диссертация иллюстрирована 9 таблицами, 62 рисунком. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка литературы, состоящего из 50 отечественных и 202 зарубежных публикаций.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

1.1. Биологические образцы.

1.1.1. Искользованные микроорганизмы. *Trichoderma asperellum* 551, выделенный из почв Республики Татарстан, *Trichoderma harzianum* 3, выделенный из почв Египта, *Aspergillus awamori* 66А, предоставленный лабораторией Эдинбургского университета, *Aspergillus flavus*, предоставленный музеем кафедры микробиологии МГУ, *Fusarium oxyspori*, выделенный из семян кукурузы и почв РТ. Промышленный биопрепарат «Мизорин», созданный на основе бактерий рода *Bacillus*, был получен от ООО «НПИ «Биопрепараты», Казань, Россия.

1.1.2. Клетки HeLa. 1×10^5 клеток/мл поддерживались на минимальной среде (МЕМ), при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂.

1.1.3. Подопытные животные. Взрослые самцы белых мышей стока CD-1 с массой тела 21 г (Питомник лабораторных животных «Пушино» ФИБХ РАН).

1.1.4. Семена кукурузы. 8 сортов семян отечественной кукурузы (Россия): Краснодарский 2007, Краснодарский 2008, Поволжский, Росс 145, Российская-1, Россбелая-1, Молдавский 218 и 1 сорт зарубежной - Giza baladi (Египет).

1.2. Методы исследования.

1.2.1. Морфолого-культуральные свойства изучали на картофельно-глюкозном агаре (КГА), на среде Чапека-Докса с низким содержанием сахарозы, на специальном питательном агаре (SNA) (по Samuels *et al.*, 1998). Для выращивания использовали как агаризованные, так и жидкие среды.

1.2.2. Размеры объектов измеряли с помощью окуляр-микрометра, так же с помощью программы Paint.

1.2.3. Антагонистическую активность и конкурентоспособность изолятов *Trichoderma* определяли методом встречных культур на средах Чапека и КГА (Семонян и Мамиконян, 1982).

1.2.4. *Определение ксиланазной, протеазной и целлюлазной активностей* изолятов *Trichoderma* проводили по методу окрашивания редуцирующих сахаров (Konig, 2002).

1.2.5. *Определение фитотоксичности культуральной жидкости* проводили на 8 сортах кукурузы (Samuels, 1999).

1.2.6. *Полевые опыты*, по оценке влияния исследуемых биопрепаратов, произведённых на основе штаммов *T.551* и *T.3* и промышленного биофунгицида Мизорин, проводили на серой лесной почве Лаишевского района и черноземе Черемшанского района РТ.

1.2.7. *ИФА методом* осуществлялась оценка влияния действия метаболитов *T. 551* и *T.3* на выработку афлатоксина В1 и охратоксина А, которые синтезируются токсинообразующим микромицетом *Aspergillus flavus*. Оптическую плотность измеряли при 450 нм на спектрофотометре.

1.2.8. *Воздействие амфотерицина на клеточный ответ A. awamori* оценивали после культивирования *A. awamori* при 30°C в жидкой среде Фогеля с добавлением сахарозы (среда ВС) и на плотной среде (2% агар) того же состава, обогащенной глюкозой (среда ОСТ) (Nelson *et al.*, 2004).

1.2.9. *Цитотоксическую активность метаболитов Trichoderma* оценивали *in vitro* на клетках линии HeLa. Проводилось совместное культивирование в течение 30 и 60 мин при 37°C. После инкубации клетки окрашивали трипановым синим. Жизнеспособность клеток HeLa рассчитывали в процентах живых клеток по отношению к общему числу.

1.2.10. *Количественное определение элементарного состава* в клетках и культуральной жидкости микромицетов проводили в соответствии со стандартами РФ согласно методическим указаниям (МУК 4.1.1483-03). Измерения осуществляли на масс-спектрометре Elan DRC II (PerkinElmer), образцы предварительно подвергали микроволновой подготовке и системе MWS-3 (Berghof) при температуре 150°C, в присутствии азотной кислоты (1мл) и бидистиллированной воды (4 мл).

1.2.11. *Определение онкогенности метаболитов Trichoderma in vivo* проводили на фоне стимуляции опухолеобразования пиреном по комплексу: гематологических, гистологических, иммунологических и биохимических показателей. Животные содержались согласно международным этическим нормам. Животные получали воду и корм *ad libitum*. Макрогруппа из 25 мышей была разделена на 5 групп, которым вводили культуральную жидкость *T. asperellum* (1.25мл / 100 г вес тела) и пирен (5мг / 100 г вес тела). В контрольной группе мышей инъецировали внутрибрюшинно каждые 24 ч в течение 14 сут стерильной водой для инъекций. Мышам второй группы сначала вводили каждые 24 ч в течение 7 сут культуральную жидкость *Trichoderma*, затем каждые 24 ч в течение 7 сут пирен. Третьей группе сначала каждые 24 часа в течение 7 суток вводили пирен, затем каждые 24 часа в течение следующих 7 суток – культуральную жидкость. Четвертая группа была подвергнута действию

пирена в течение 7 суток. И пятую группу инъектировали только культуральной жидкостью в течение 7 суток.

Общий вес мышей определяли в течение 14 дней ежедневным взвешиванием до принятия пищи. После окончания эксперимента определяли вес отдельных органов мышей (печени, почек, селезёнки, яичек). Затем определяли отношение массы органов к общей массе мышей.

1.2.12. Гематологическое исследование проводили методом подсчёта количества красных кровяных телец, уровня гемоглобина, гематокрит (объём форменных элементов крови), среднего объёма эритроцита (MCV), гемоглобина (MCH) и гемоглобина в эритроците (MCHC), используя ЭДТА-содержащие пробирки. Подсчёт красных кровяных телец осуществляли с помощью камеры Горяева в физиологическом растворе (0,9% NaCl) (Dacie, Lewis, 1991). Процент гемоглобина определяли в соответствии с рекомендациями Международного Комитета Стандартизации в Гематологии (ICSH, 1967), используя коммерческий набор Randox Company (Великобритания). Гематокрит определяли центрифугированием клеток в гепаринизированных гематокритных пробирках (капиллярные пробирки с внутренним диаметром 1мм и 7,5см длиной) в течение 5 минут 15000rpm (Dacie, Lewis, 1991). MCV, MCH и MCHC рассчитывались, исходя из формул:

$$MCV(Fl) = \frac{Hct (ml/dl)}{RBCs (million/ml)} \times 10$$

$$MCH(pg) = \frac{Hb (g/dl)}{RBCs (million/ml)}$$

$$MCHC(g/dl) = \frac{Hb (g/dl)}{Hct (ml/dl)} \times 100,$$

где Fl – фемтолитр = 10^{-15} , Pg – пикограмм = 10^{-12} .

1.2.13. Иммунологическое исследование проводили методом подсчета белых кровяных телец с помощью камеры Горяева, используя специальный раствор Тюрка, а также дифференциальный подсчёт лейкоцитов, число которых рассчитывали согласно рекомендациям Dacie и Lewis (Dacie, Lewis, 1991).

1.2.14. Оценка биохимических показателей включала в себя тест на функционирование: печени (активность трансаминазы и кол-во общего билирубина) и почек (содержание мочевины и креатинина). Активность аланинаминотрансферазы сыворотки крови мышей определяли согласно методике (Reitman, Frankel, 1957). Сыворотка крови была получена на 14 день эксперимента перед эвтаназией мышей. Для определения активности использовали коммерческий набор BioMerieux Chemical Company (Франция). Калибровочная кривая была построена по аланину.

Активность сывороточной аспаратаминотрансферазы измеряли аналогично аланинаминотрансферазе, используя коммерческий набор Randox Company (Великобритания).

Концентрацию общего билирубина определяли, используя коммерческий набор BioMerieux Chemical Company (Франция). Количество общего билирубина определялось в реакции конъюгации с диазотированной сульфаниловой кислотой в присутствии кофеина (Tietz, 1983).

Концентрация мочевины в сыворотке крови мышей определяли по реакции с мочевиноглутаматдегидрогеназой по методике Eisenweiner, 1976. Содержание общего креатинина измеряли в реакции с пикриновой кислотой в щелочной среде с образованием окрашенного комплекса, поглощающего при длине 510нм (Bartles *et al.*, 1972; Larsen, 1972). Ткани фиксировали в растворе формалина и метанола, обезживали и пропитывали парафином. Из парафиновых блоков делали срезы толщиной 4-6 мкм.

1.2.15. Гистологические препараты готовили по стандартной схеме. Готовили парафиновые блоки, затем срезы толщиной 4-6 мкм окрашивали гематоксилином-эозином. Срезы заключали в полистирол.

1.2.16. Определение электрокинетического потенциала конидий антагониста и фитопатогенов измеряли на анализаторе Zeta Sizer.

1.2.17. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы SPSS 17. Все эксперименты обрабатывались по методу F-теста Фишера с коэффициентом значимости $p = 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С учетом того, что используемые в практике биопрепараты должны соответствовать Гесту России и проверяться на различных системах живых организмов, нами было проведено исследование влияния метаболитов плесневых грибов рода *Trichoderma* на микроорганизмы, теплокровные животные, растения, клетки HeLa и на онкогенность.

2.1. Антибиотическая активность грибов рода *Trichoderma* к фитопатогенам растений и почве в опытах *in vitro*.

2.1.1. Влияние грибов рода *Trichoderma* на рост фитопатогенных микромицетов *Fusarium oxysporum* и *Aspergillus flavus*.

Проводилось исследование влияния *T. asperellum* 551 на фитопатоген *F. oxysporum* и токсинобразующий патоген *A. flavus* в соотношении конидий антагонист : фитопатоген 1:1, 1:2 и 1:3. Наибольшая антагонистическая активность выявлена при соотношении конидий 1:3.

Удельная скорость роста *T. asperellum* 551 в течение первых 24 часов резко возрастала и ингибировала рост *F. oxysporum* (A) и *A. flavus* (B) ($p \leq 0,05$) (рисунок 1)

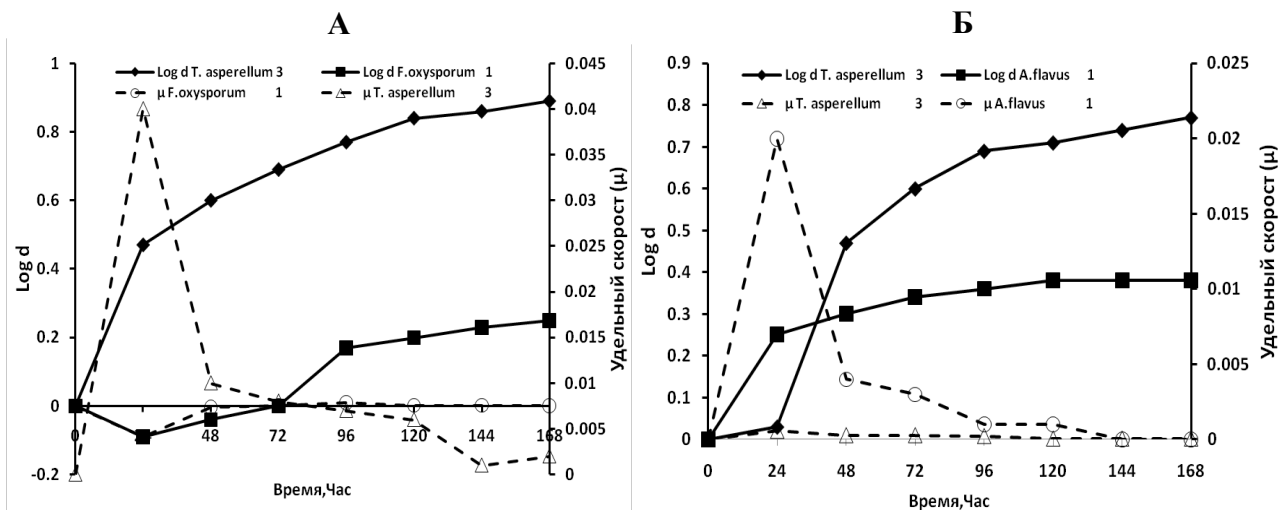


Рис. 1. Изменение удельной скорости роста *T. asperellum* 551 при совместном культивировании с *F. oxysporum* (А) и с *A. flavus* (Б) на плотной среде КГА. Цифрами указано соотношение количества конидий антагонист : фитопатоген (1:3) Сплошной линией обозначена уд. скорость роста, штрихом – log численности.

По типу антагонизма взаимоотношения *T. asperellum* с *F. oxysporum* можно отнести к паразитизму – Е типа, т.к. наблюдалось нарастание колонии антагониста на колонию фитопатогена, а в случае с *Aspergillus* – паразитизм В-типа – остановка роста при взаимодействии антагониста и патогена.

Во всех случаях нами отмечено увеличение размера конидий антагониста при контакте с фитопатогеном. Наибольшее увеличение размера конидий отмечено при контакте с *F. oxysporum* (рис.2А). Ранее отмечалось, что увеличение размера конидий грибов рода *Trichoderma* происходит только под влиянием комплекса внешних факторов (Алимова, 2006).

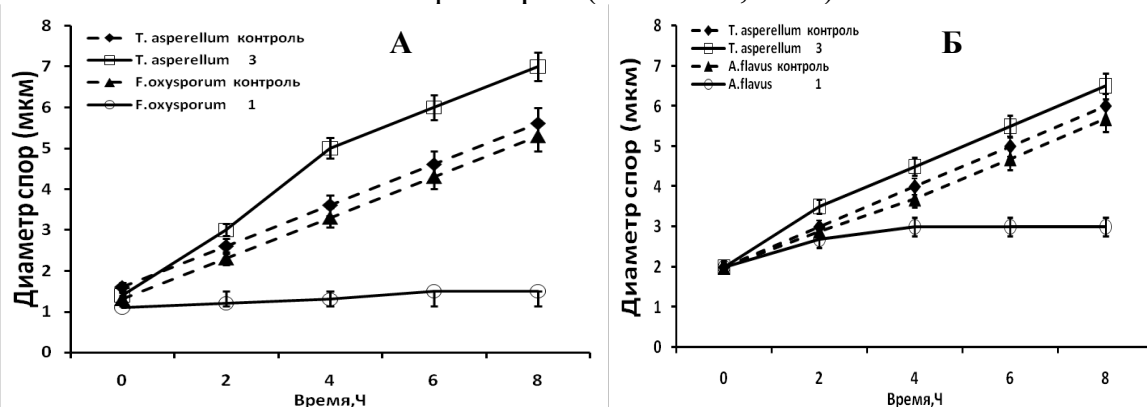


Рис.2. Динамика изменения размера спор *T. asperellum* 551 при совместном культивировании с *F. oxysporum* (А) и с *A. flavus* (Б) на плотной среде КГА. Цифрами указано соотношение количества конидий *Trichoderma* с опытными микромицетами (1:3).

2.1.2. Влияние грибов рода *Trichoderma* на выработку афлатоксина В1 и ократоксина А, грибами рода *A. flavus*.

Нами выявлена способность исследуемых видов *A. flavus* к образованию афлатоксина и ократоксина А. При взаимодействии *T. asperellum* 551 и *T. harzianum* 3 с *A. flavus*, отмечено увеличение (Б) теза ократоксина А (рисунок

3А), что указывает на фунгистатическое действие антагониста, приводящее к угнетению роста *A.flavus*.

Наблюдаемый эффект можно объяснить тем, что присутствие антагонистов в среде усиливает "агрессивное" поведение *A. flavus* и вызывает продукцию вторичных метаболитов с антибиотической активностью и оказывает ингибирующее действие на рост и развитие других микроорганизмов на уровне транскрипции генов, созревании белка или разрушении структуры клетки, например, клеточной стенки. Возможно, увеличение выработки охратоксина А также связано со стрессовыми условиями для данного патогена. Предыдущие результаты показали, что грибы рода *Trichoderma* ингибируют рост *A. flavus*, поэтому в условиях конкуренции и в присутствии комплекса литических ферментов *Trichoderma* может происходить запуск данных биохимических реакций, приводящих к выработке охратоксина А.

В следующей серии экспериментов нами было изучено влияние исследуемых штаммов *Trichoderma* на синтез афлатоксина В1 (рисунок 3Б) микромицетом *A. flavus*. Культивирование *A. flavus* с *T. harzianum*3 приводило к увеличению продукции афлатоксина В1, как и в случае выработки охратоксина А. При совместном культивировании *T. asperellum* 551 и *A. flavus* афлатоксин не синтезировался, что вероятно указывает на фунгицидное действие антагониста.

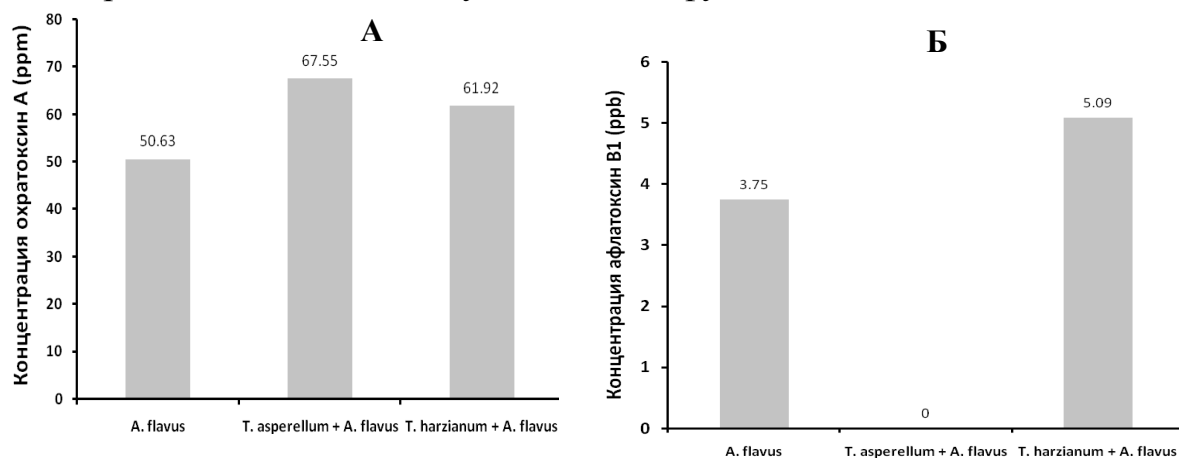


Рис. 3. Влияние *T. harzianum* 3 и *T.asperellum* 551 на выработку охратоксина А (А) и афлатоксина В1 (Б) микромицетом *A.flavus* при совместном культивировании на среде Чапека в опытах *in vitro*

Таким образом, обработка фитопатогена отдельными штаммами *Trichoderma* может быть использована для подавления токсинообразования плесневыми грибами при контаминации растительного материала грибами. Штаммы, приводящие к увеличению токсинообразования, могут быть использованы, как биосенсоры, определяющие наличие следовых количеств токсинов.

2.1.3. Влияние *Trichoderma* на микромицеты рода *A.awamori*.

Взаимодействие *Trichoderma* с микромицетами рода *A.awamori* рассматривалось нами, как модель влияния метаболитов антагониста на

возбудителей микозов у теплокровных животных, на плесневение семян и почвоутомление. В качестве альтернативного препарата медицинского и ветеринарного назначения рассматривался амфотерицин, аналог некоторых фунгицидов, используемых и в почвенной биотехнологии.

В случае ингибирования роста *A.awamori* наибольшая удельная скорость роста антагониста отмечена только на 48 час роста, что указывает, вероятно, на интенсивное токсинообразование и высокую антагонистическую активность *T.asperellum* 551. Нами было показано что, *T.asperellum* 551 подавляло рост *A. awamori* возможно это обусловлено проявлением антибиотической активности исследуемого изолята *Trichoderma*. При совместном культивировании удельная скорость роста *T.asperellum* возрастала на 70 % по сравнению с контролем (рисунок 4А). При этом удельная скорость роста *A. awamori* снижалась на 60 % (с 0.01 до 0.009 в соотношении 3:1). Радиус конидий возбудителей микозов зависел также от концентрации метаболитов антагониста в культуральной жидкости. С увеличением соотношения антагонист - патоген с 1: 1 до 1:2 и 1:3 размер конидий патогена уменьшился на 40% (с 2 до 1.2 см), что указывало на фунгицидный эффект воздействия антагониста, Также, нами отмечено увеличение размера конидий антагониста при контакте с *A. awamori* (рисунок 4Б).

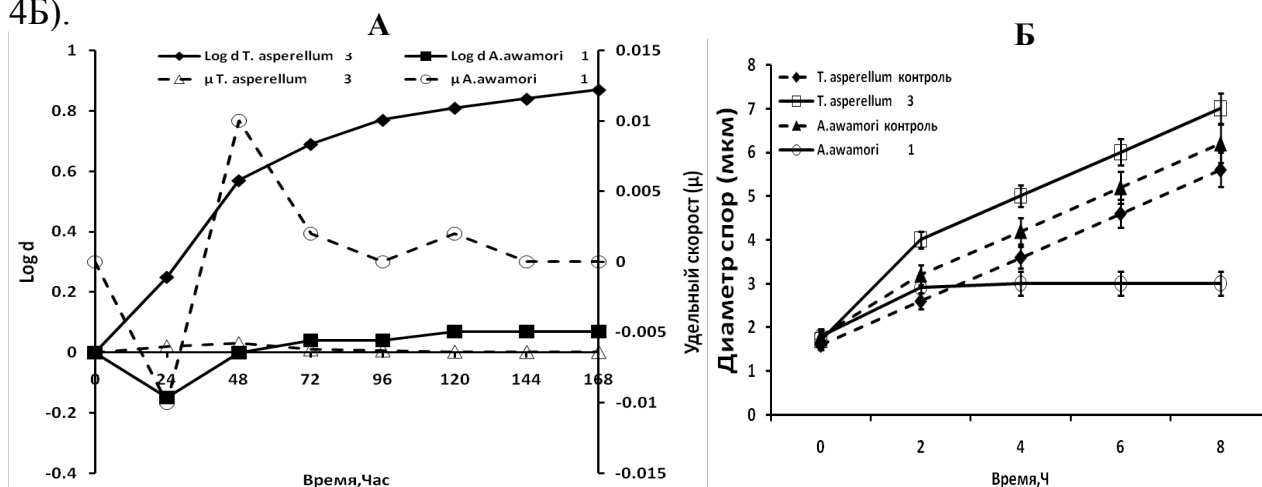


Рис. 4. Изменение удельной скорости роста *T.asperellum* 551 (А) и размера спор (Б) при совместном культивировании с *A.awamori* на плотной среде КГА. Цифрами указано соотношение количества конидий *Trichoderma* с опытными микромицетами (1:3). Сплошной линией обозначена уд.скорость роста, штрихом – log численности.

Таким образом, наибольший антагонистический эффект *Trichoderma* проявлялся при соотношении конидий *T.asperellum* 551 и *A. awamori* 3:1 соответственно. В связи с этим представляло интерес изучить влияние промышленного аналога - антибиотика микробного происхождения амфотерицина с фунгицидным типом действия на рост и развитие *A. awamori*. Эта модель может быть также использована также для изучения действия фунгицидов на опасные плесневые грибы рода *Aspergillus niger*, которые в лабораторных опытах, как правило, заменяются безопасным видом *A. awamori*.

Было установлено, что на протяжении 6 часовой инкубации в среде с амфотерицином (опыт) изменение размера спор зависело от концентрации фунгицида. В отличие от контроля (среда без фунгицида) амфотерицин в дозах 2.5 и 5.0 мкМ через 2 ч инкубации стимулировал увеличение диаметра спор на 40% и 20% соответственно. Вместе с тем более высокое содержание фунгицида в среде (10, 20 мкМ) подавляло процесс набухания спор (рисунок 5). Таким образом, найдена пороговая концентрация фунгицида, которая вызывает набухание конидий. Дальнейшее увеличение концентрации снижает реакцию до его полного отсутствия.

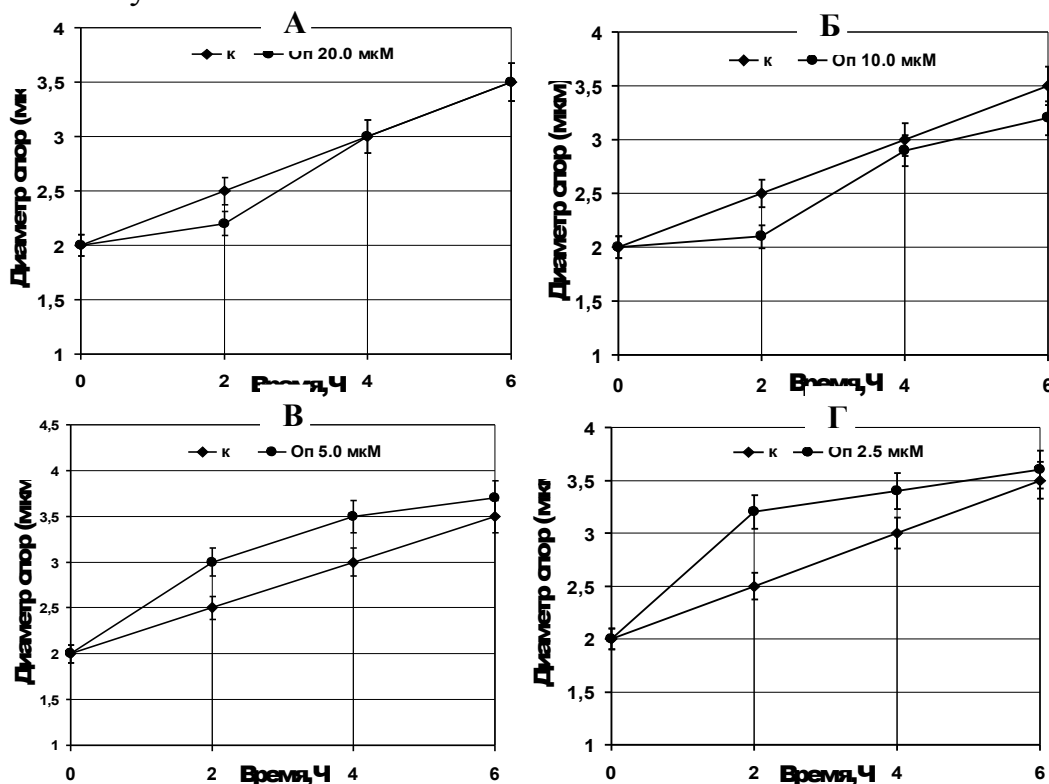


Рис.5. Динамика изменения размера спор *A. awamori* при инкубации в среде Вогеля, содержащей разные концентрации амфотерицина, К – среда без фунгицида; ОП– варианты опыта с фунгицидом в дозах 20, 10, 5.0, 2.5 мкМ, соответственно, (А), (Б), (В), (Г). Наиболее четко ингибирующий эффект амфотерицина в дозе 20 мкМ был выражен через 2 ч инкубации, который составлял 91,5% от контроля, принятого за 100%. К концу периода исследования (6 ч) эффект ингибирования нивелировался. При инкубации спор в среде с амфотерицином в дозе 10 мкМ ингибирующее действие фунгицида сохранялось до конца эксперимента.

Сравнительный анализ действия амфотерицина и *Trichoderma* на изменение скорости роста и размер спор *A. awamori* показали что, под влиянием *Trichoderma* удельная скорость роста *A. awamori* уменьшилась с 0.02 до -0.01 и размер спор уменьшился на 60 % по сравнению с контролем. С другой стороны под влиянием амфотерицина удельная скорость роста снизилась с 0.01 до -0.0 и размер спор уменьшился на 40 % по сравнению с контролем. На основании наших экспериментов, можно рассматривать метаболиты *Trichoderma*, как

фунгицидное средство против *A. awamori*, не уступающее по отдельным параметрам фунгициду - амфотерицин. Возможна экстраполяция данных эксперимента по влиянию КЖ *Trichoderma*, как фунгицидного средства против *A. awamori*, как модель для изучения влияния пестицидов для контроля содержания в почве токсинообразующих грибов *Aspergillus niger*. Таким образом, КЖ *Trichoderma* может рассматриваться, как эффективная альтернатива амфотерицину как фунгициду медицинского назначения для лечения микозов, а также пестицидов для контроля токсинообразующей плесени в почве. Таким образом, ингибирующее действие метаболитов антагониста на набухание конидий, возбудителей микозов в соотношении 3:1 сопоставимо с концентрацией фунгицида амфотерицина 10, 20 мкМ.

2.2. Изучение электрокинетического потенциала конидий микромицетов *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus*.

Различные штаммы *Trichoderma* имеют разную активность по отношению к патогенным грибам; их взаимное влияние друг на друга может варьировать. Поэтому одним из перспективных аспектов биологии является изучение механизмов, участвующих в подавлении заболеваний биоконтрольными агентами. Возможные механизмы антагонизма видов *Trichoderma* включают такие процессы как конкуренция за питательный субстрат и экологическую нишу, антибиоз за счёт выделения летучих компонентов и нелетучих антибиотиков (Harman, Nadar, 1983; Dennis, Webster, 1971), которые ингибируют развитие ряда почвенных грибов, а также паразитизм (Dennis, Webster, 1971a). Нами сделано предположение, что одним из возможных механизмов антагонизма является изменение электрокинетического потенциала поверхностных структур конидий.

Электрокинетический потенциал или поверхностный заряд является важной характеристикой живой клетки, которая часто определяет способность клетки взаимодействовать с веществами разной природы и другими клетками. В связи с этим предложено определять заряд клеток *T. asperellum* 551 и *T. harzianum* 3, культивируемых на средах Чапека и КГА. Как видно из данных таблицы 1, разные виды грибов рода *Trichoderma* отличаются по уровню электрокинетического потенциала. При этом уровень электрокинетического потенциала не зависел от среды культивирования, а только от вида *Trichoderma* (таблица 1).

Таблица 1

Электрокинетический потенциал спор грибов рода *Trichoderma*

Род	электрокинетический потенциала (мВ)	среда
<i>T. asperellum</i> 551	- 40.80	КГА
<i>T. asperellum</i> 551	- 38.80	Чапека
<i>T. harzianum</i> 3	- 60.00	КГА

<i>T. harzianum 3</i>	- 55.30	Чапека
-----------------------	---------	--------

2.2.1. Изучение поверхностного заряда спор при взаимодействии различных видов *Trichoderma* с фитопатогенами.

Было протестировано изменение поверхностного заряда спор при взаимодействии культур фитопатогенных микромицетов и их антагонистов методом динамического светорассеяния. В качестве фитопатогенов рассмотрены грибы *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus awamori* и *Aspergillus flavus*. В наших экспериментах отбирались споры антагонистов *T. asperellum 551* и *T. harzianum 3* после совместного культивирования с фитопатогеном в зоне непосредственной близости к колониям. Изменение поверхностного заряда спор регистрировали на анализаторе Zeta Sizer (Malvern), было показано достоверное изменение поверхностного заряда спор как у *T.harzianum* при совместном культивировании их с *F. oxysporum* и *A. flavus*, так и у фитопатогенов, причём клетки после взаимодействия приобретали положительный суммарный заряд.

Аналогичная тенденция к изменению поверхностного заряда спор отмечена и у *T.asperellum* при культивировании с патогенными грибами рода *A. flavus* и *A. Awamori*. Однако *T.asperellum* вызывает в большей степени изменения поверхностного заряда, чем *T. harzianum*. Поверхностный заряд спор грибов зависит от химической структуры и состава их клеточной стенки. По видимому стрессовые воздействия, к которым относится антагонизм, способствуют изменению метаболической активности грибов и состояния и возможно состава их клеточной стенки. Однако этот вывод является нашим предположением, и требует дополнительных подтверждений. Тем не менее, полученные результаты позволяют нам утверждать, что метод динамического светорассеяния является перспективным методом изучения клеточной стенки грибов и влияния на ее свойства различных факторов среды, в том числе негативного влияния культур друг на друга (таблица 2).

.Таблица 2

Изменение поверхностного заряда спор при взаимодействии культур микроорганизмов в разных сочетаниях.

Род			электрокинетический потенциала (мВ)	
			опыт	контроль
1.	<i>T. asperellum 551</i>	<i>F.oxysporum</i>	- 36.66	- 40.80
		<i>A. Awamori</i>	- 31.16	
		<i>A. flavus</i>	- 36.66	
2.	<i>T.harzianum 3</i>	<i>F.oxysporum</i>	- 44.83	- 60.00
		<i>A. awamori</i>	- 52.10	
		<i>A. flavus</i>	- 44.86	
3.	<i>F.oxysporum</i>	<i>T.asperellum 551</i>	- *43.00	- 35.83
		<i>T. harzianum 3</i>	- 29.63	

4.	<i>A. awamori</i>	<i>T. asperellum</i> 551	- 38.36	- 50.26
		<i>T. harzianum</i> 3	- 42.20	
5.	<i>A. flavus</i>	<i>T. asperellum</i> 551	- *41.10	- 32.75
		<i>T. harzianum</i> 3	- 27.70	

Таким образом, показано, что изучение поверхностного заряда спор грибов методом динамического светорассеяния является дополнительным и перспективным способом изучения антагонистических отношений.

2.3. Влияние *T. asperellum* и *T. harzianum* на опухолевые клетки HeLa.

В наших экспериментах различные разведения культурального фильтрата грибов *T. asperellum* и *T. harzianum* приводили к уменьшению числа жизнеспособных клеток HeLa через 30 и 60 минут (рисунок 6). Повышение концентрации культуральной жидкости антагониста и времени контакта с 30 мин до 60 мин снижает численность жизнеспособных клеток HeLa. Максимальный цитотоксический эффект (50 %) для *T. asperellum* 551 отмечен при 40% концентрации Кж через 60 минут инкубации (30⁰C).

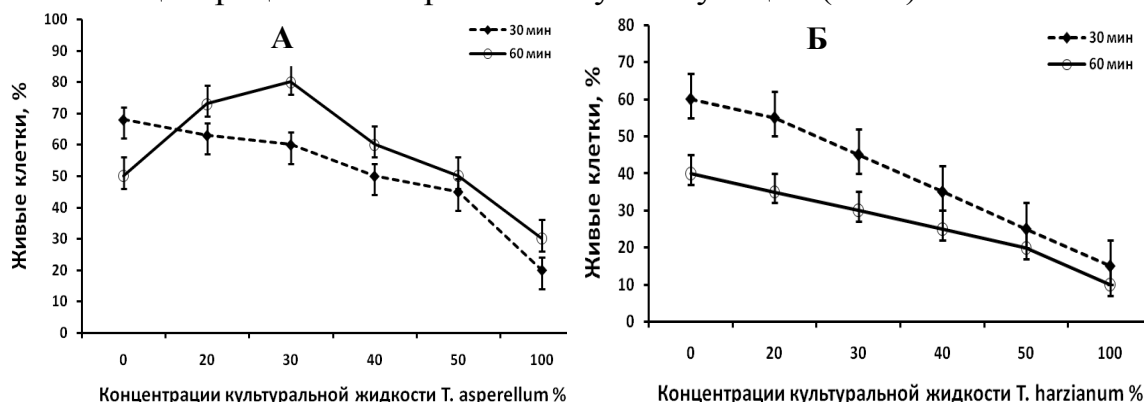


Рис. 6. Влияние концентрации культуральной жидкости *T. asperellum* 551 (А) и *T. harzianum* 3 (Б) на клетки HeLa (в % живых клеток).

Микромицет *T. harzianum* 3 обладал менее выраженным цитотоксическим эффектом в отношении клеток HeLa. Максимальное (LD₅₀) на клетках HeLa регистрируется при экспозиции 60 мин и концентрации Кж 50%. Таким образом, *T. asperellum* 551 обладает более выраженным цитотоксическим эффектом по отношению к клеткам HeLa, чем *T. harzianum* 3.

2.4. Влияние культуральной жидкости *Trichoderma* и пирена на гематологические, гистологические, иммунологические и биохимические показатели мышей CD-1.

Обязательным пунктом исследования биопрепаратов является определение на онкогенность. Как средство оценки статуса здоровья животных, WHO (1963) рекомендовано изучение гематологических параметров, играющих жизненно важную роль в физиологическом и патологическом состоянии организма.

В связи с этим нами изучались гематологические, биохимические иммунологические и гистологические показатели мышей при воздействии на них КЖ *Trichoderma*, а также индуктора опухолей вещества химической природы - пирена. Нами было показано, что пирен способствовал достоверному ($P<0,05$) уменьшению количества эритроцитов в крови опытных мышей по сравнению с контролем (рисунок 7А). Данный факт свидетельствует о возможном разрушении эритроцитов. Обработка мышей культуральной жидкостью до или после пирена нивелировала действие последнего.

Нами в опытах *in vivo* на мышах CD-1 было показано влияние культуральной жидкости гриба *T. asperellum* на содержание гемоглобина и гематокрита, которые являются показателем гематологического статуса организма. На рисунке 7Б показано, что пирен достоверно ($P<0,05$) повышает уровень гемоглобина мышей относительно контроля. Влияние культуральной жидкости *Trichoderma* близко к контрольному значению. Важно отметить, что предварительная обработка культуральной жидкостью приводит к снижению действия пирена на уровень гемоглобина относительно контроля, т.е. нивелирование проявления онкогенности.

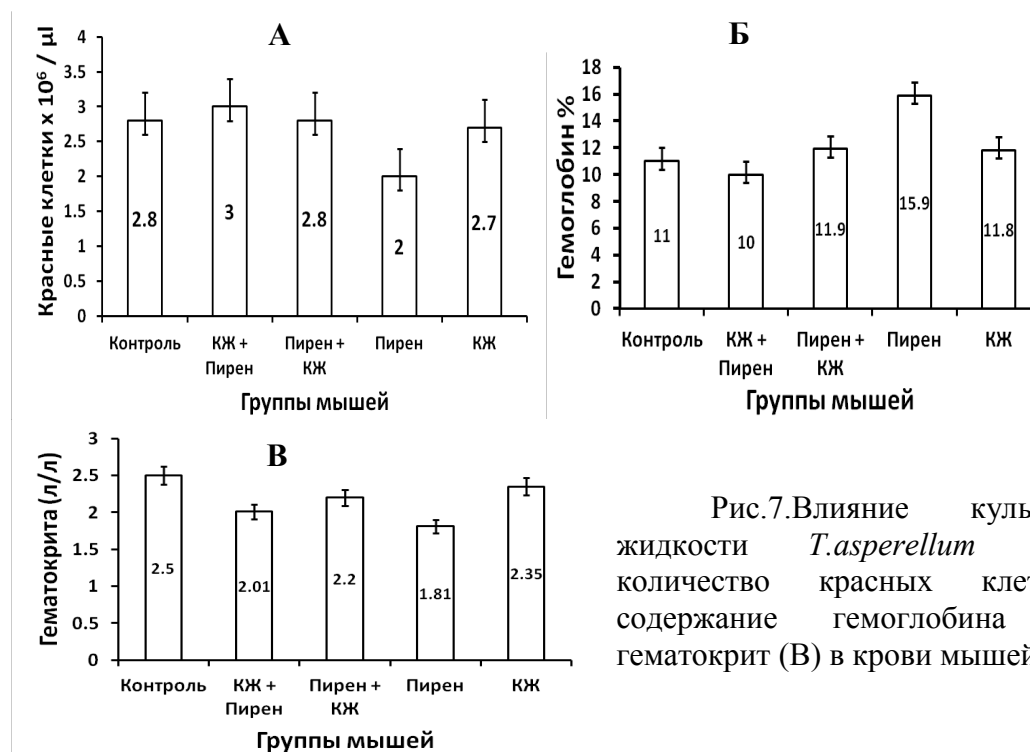


Рис.7. Влияние культуральной жидкости *T. asperellum* 551 на количество красных клеток (А), содержание гемоглобина (Б) и гематокрит (В) в крови мышей.

Далее приведены данные, указывающие на то, что все значения гематокрита мышей после инъектирования их исследуемыми веществами ниже контрольных значений (рис. 7В). Но при предобработке мышей КЖ *Trichoderma* до введения им пирена также происходит снижение гематокрита относительно контрольных значений. Отмечено, что проявляется противоположный эффект между уровнем гемоглобина и гематокритом в действии пирена.

Было протестировано действие пирена и метаболитов в КЖ *T. asperellum* на основные показатели функционирования печени, а именно, активность аспартатаминотрансферазы (Рис. 8А) и аланинтрансаминазы (Рис. 8Б), а также концентрацию билирубина (Рис. 8В) в сыворотке крови. Обнаружили, что инъектирование мышей культуральным фильтратом микромицета *T. asperellum* 551 во всех случаях не приводило к каким-либо отличиям относительно контроля. Продолжительное инъектирование пиреном вызывало достоверном ($p < 0,05$) увеличению активности данных трансаминаз, а также концентрации билирубина, что свидетельствует об интоксикации организма. Следует отметить, что инъектирование мышей метаболитами в кж *T. asperellum* 551 в целом оказывает положительное влияние. Отмечена тенденция к улучшению состояния мышей при инъекции фильтрата *T. asperellum* 551 до обработки пиреном, по сравнению с вариантом инъектирования мышей метаболитами КЖ после введения им пирена, что является, по всей видимости, показателем защитных функций метаболитов в Кж *T. asperellum* 551, предотвращающих действие пирена эффективнее, чем после действия самого пирена.

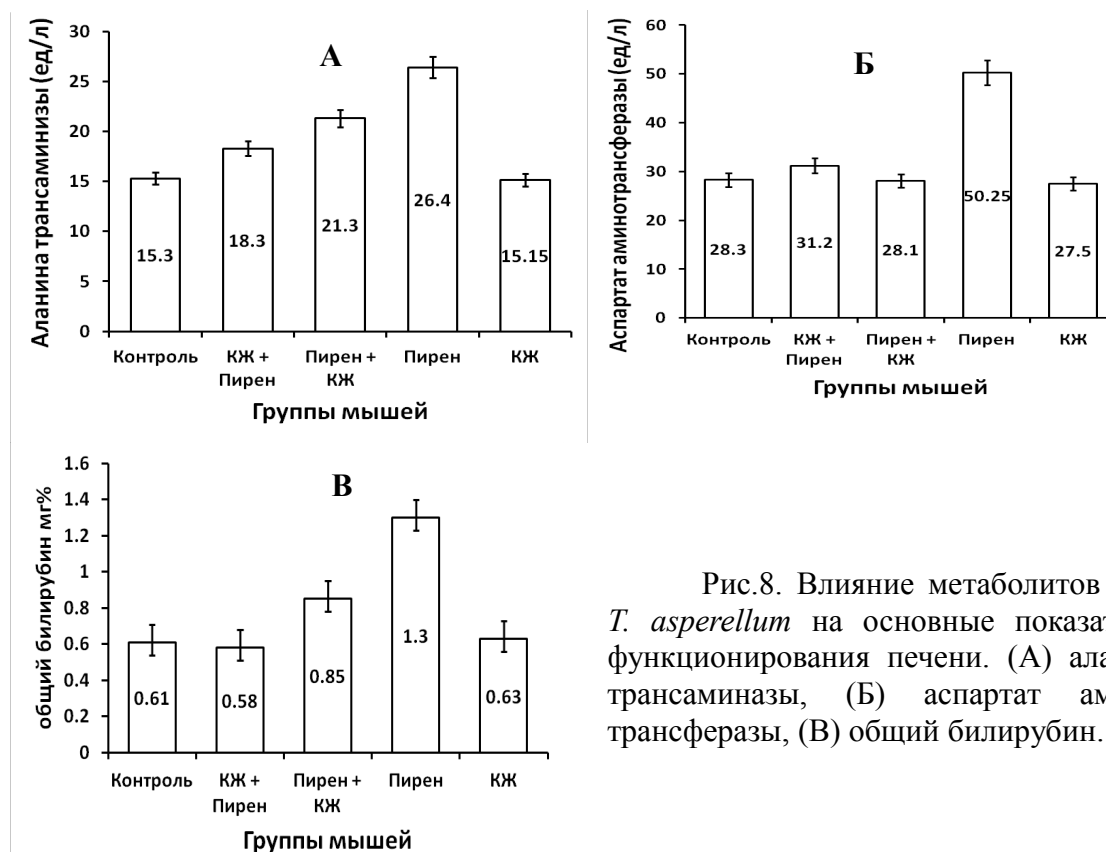


Рис.8. Влияние метаболитов КЖ *T. asperellum* на основные показатели функционирования печени. (А) аланин трансаминазы, (Б) аспартат аминоксидотрансферазы, (В) общий билирубин.

Уровень креатинина в сыворотке крови помогает оценить функционирование печени во время протекания болезни, в то время как мочевины – функционирование почек (Tambuwal *et al.*, 2002).

На рис. 7 представлено влияние метаболитов КЖ *T. asperellum* 551 на функцию почек, концентрацию мочевины (Рис. 9А) и креатинина (Рис. 9Б) в

сыворотке крови. Наблюдается достоверное ($p < 0,05$) увеличение концентрации мочевины при обработке пиреном, что указывает на дисфункцию почек, которая при инъекциях КЖ гриба *T. asperellum* 551 восстанавливается. В случае с креатинином достоверных различий при обработке пиреном или метаболитами по сравнению с контролем не было обнаружено.

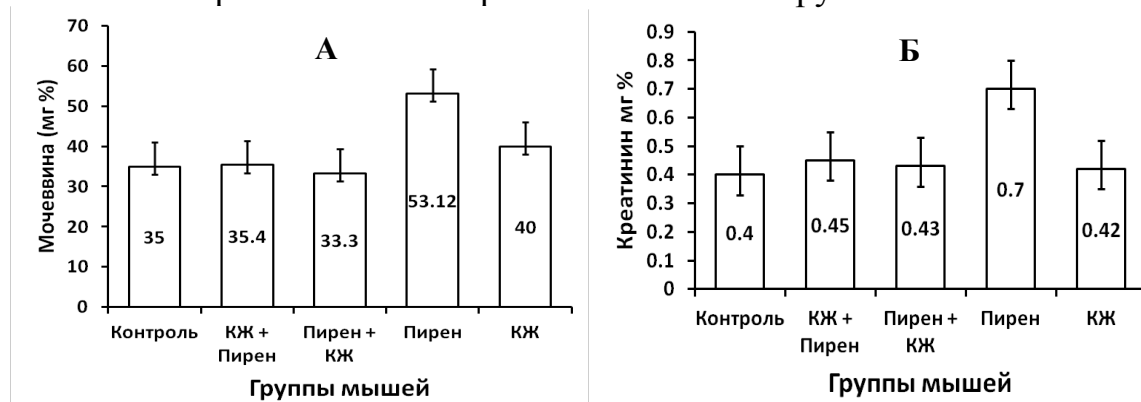


Рис.9. Влияние метаболитов КЖ *T. asperellum* на основные показатели функционирования почек (А- мочевины, Б-креатинин).

В литературе мало данных относительно иммунных механизмов, запускаемых биоконтрольными агентами после взаимодействия с компонентами врождённого и адаптивного иммунного ответов. Как представлено на рис. 10, пирен способствовал увеличению лейкоцитов по сравнению с контролем. Это значит, что пирен индуцирует иммунный ответ. Из данных также видно, что инъектирование мышей культуральной жидкостью до и (или) после введения пирена ослабляло действие пирена.

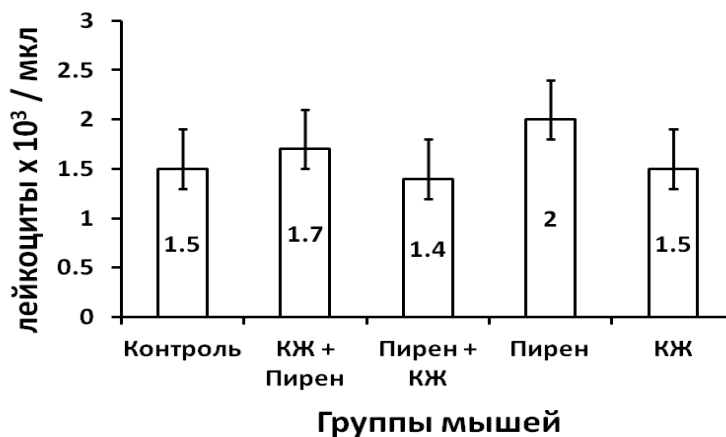


Рис.10. Влияние КЖ *T. asperellum* на общее количество лейкоцитов в крови мышей.

Инъектирование мышей культуральной жидкостью и пиреном показали различные эффекты на различные клетки иммунной системы. Обработка мышей пиреном достоверно ($p < 0,05$) увеличила процент лимфоцитов, базофилов и эозинофилов и уменьшила процент нейтрофилов в сравнении с контролем (рисунок 11). Следовательно, пирен провоцирует иммунный ответ. Это

происходит, потому что пирен имеет различное действие на каждый тип клеток иммунной системы. После инъекции культуральной жидкостью, происходит уменьшение процента моноцитов и нейтрофилов в сравнении с контролем (рисунок 11). Это доказывает, что КЖ *Trichoderma* ингибирует действие пирена, в результате чего иммунная система приходит в норму.

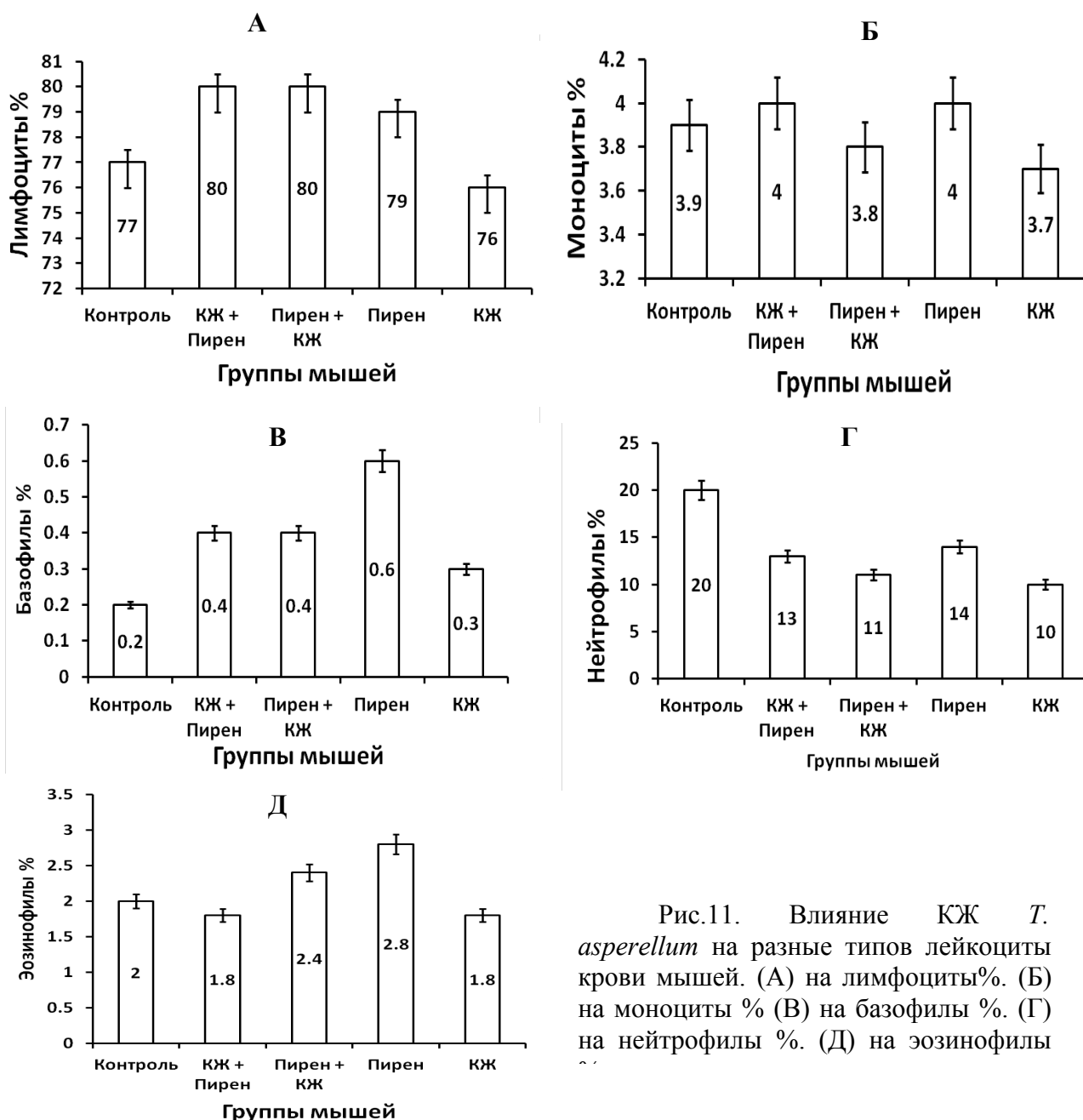


Рис.11. Влияние КЖ *T. asperellum* на разные типы лейкоциты крови мышей. (А) на лимфоциты%. (Б) на моноциты % (В) на базофилы %. (Г) на нейтрофилы %. (Д) на эозинофилы %.

На следующем этапе работы мы наблюдали влияние культуральной жидкости в кж *T. asperellum* 551 на гистопатологию печени и кожи. Показано влияние кж и пирена на ткани печени. Введение пирена вызывало дистрофию и некроз (в ответ на интоксикацию), а введение кж после обработки пиреном

тормозило развитие некротических и дистрофических процессов. Это означает, что культуральная жидкость предотвращает развитие данных процессов.

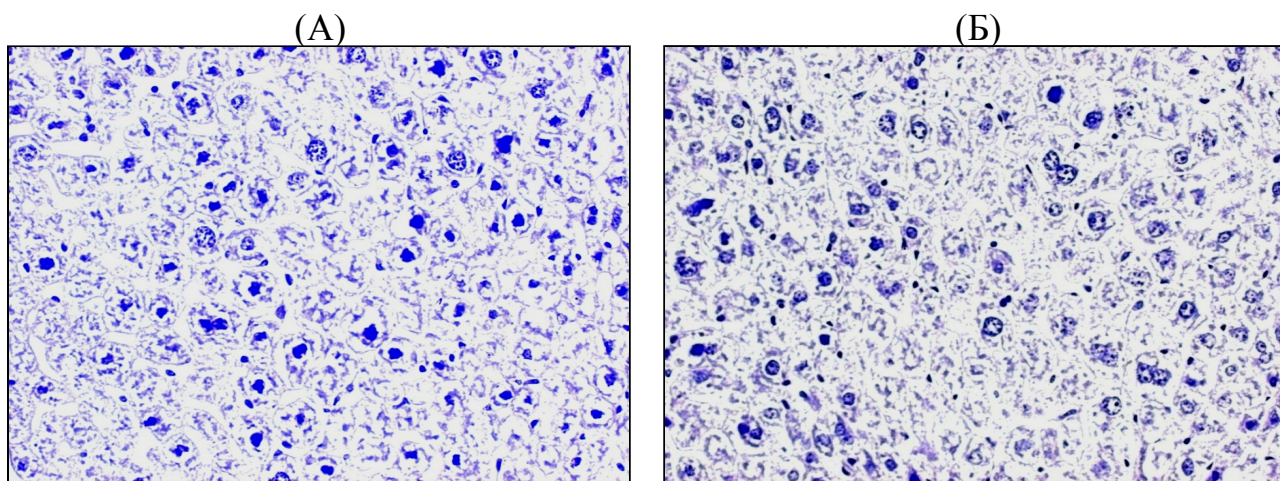


Рис.12.Влияние метаболитов *T. asperellum* и пирена на гистопатологию печени, x200,

(А) инъекция пирена, (Б) инъекция культуральной жидкости после пирена.

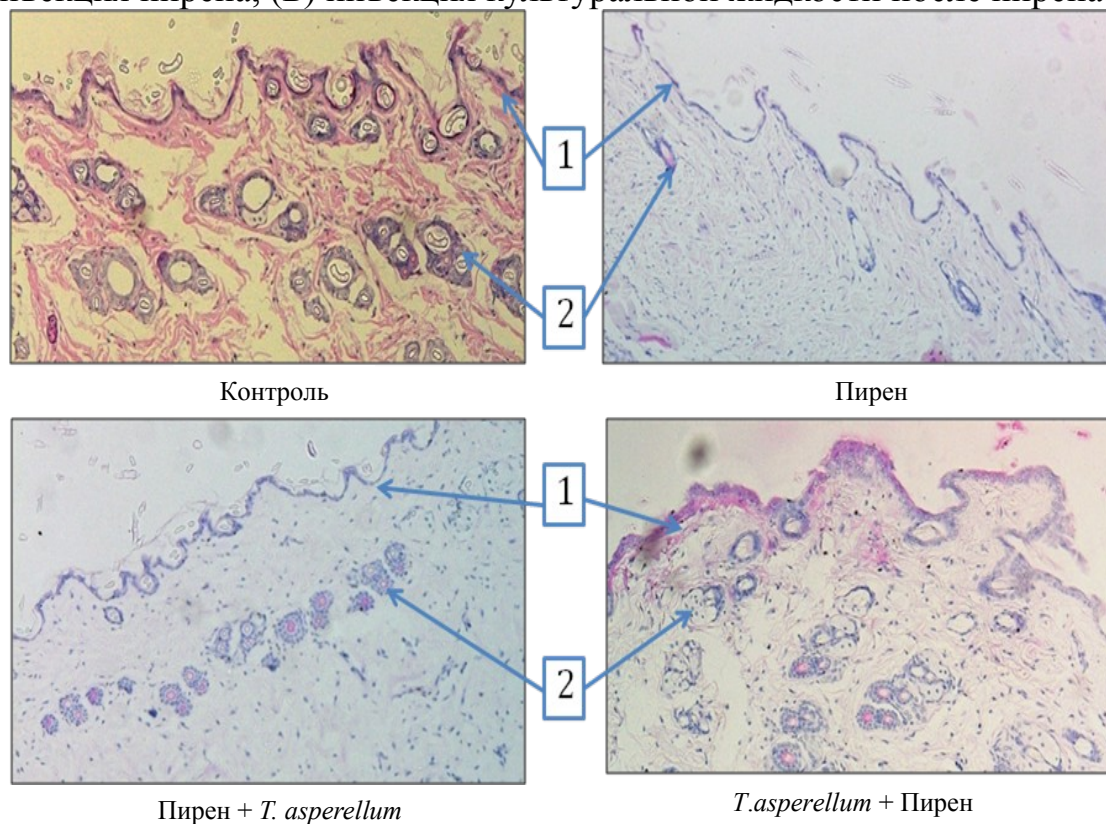


Рис.13.Влияние метаболитов *T. asperellum* на гистопатологию кожи.

1- роговой слой b 2- волосяные фолликулы.

На рис. 14 среза печени контрольной (интактной) мыши хорошо видна дольчатая структура органа, гепатоциты имеют неправильную многоугольную форму. Однако воздействие метаболитов приводит к формированию баночной формы клеток, что также свидетельствует о восстановлении ткани. Гепатоциты располагаются друг к другу рядом, образуя при этом печеночные балки или так называемые трабекулы. Клетки и печеночные балки ровные, симметричны относительно кровеносных капилляров. Щелевидные пространства равномерные, хорошо просматриваются

Через 7 дней после воздействия гепатоксина можно отметить, что баночное строение печеночной ткани слабо выражено, обнаружены полностью разрушенные участки. Гепатоциты отличаются небольшими размерами ядер и цитоплазмы. Большая часть цитоплазмы светло окрашена, мелкая, частично – угловатой формы, обеднена хроматином. Ядра мелкие, плохо обозначены, располагаются эксцентрично (по периферии), мелкие ядрышки. Отмечено небольшое содержание двухъядерных гепатоцитов (22,20%). Клетки ретикулоэндотелия малочисленны и имеют мелкие ядра. Также в сосудистой системе выявлены признаки застойной венозной гиперемии, которая проявляется расширением и полнокровием синусоидальных капилляров (преимущественно вокруг центральных вен).

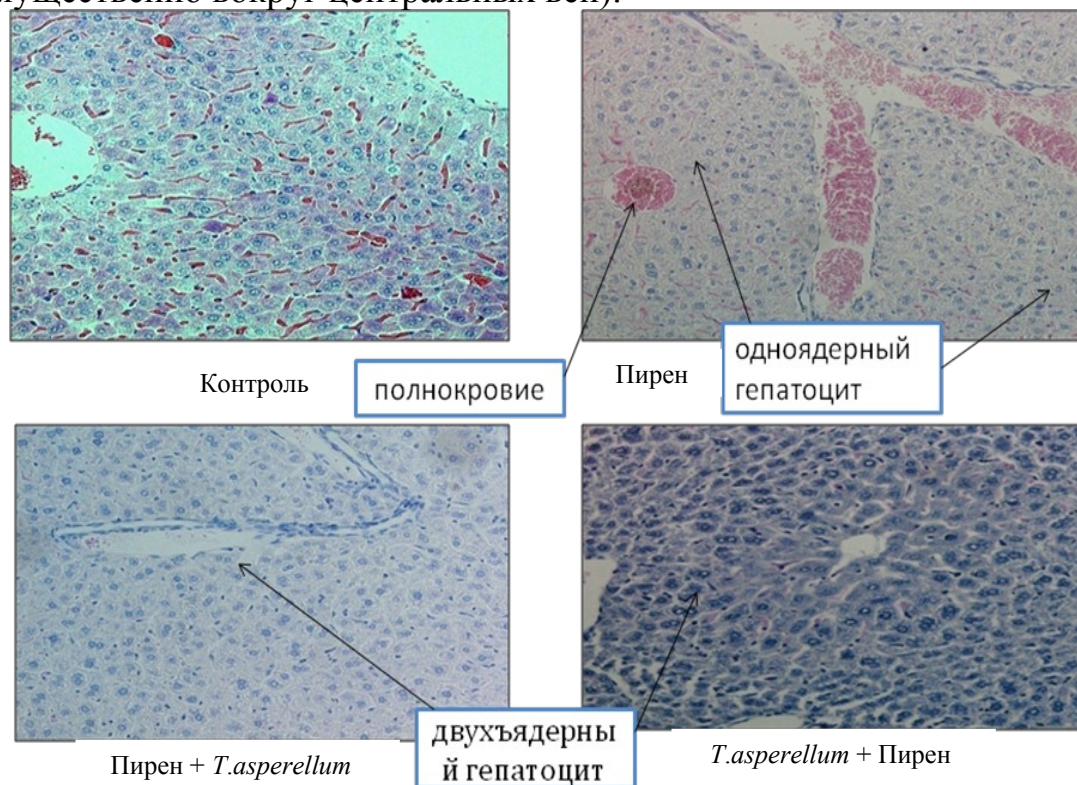


Рис.14. Влияние метаболитов *T. asperellum* на гистопатологию печени.

В печени мышей, получавшей жидкий препарат *T.asperellum*, сохранено баночное строение. Гепатоциты, формирующие печеночные балки, различаются

по объему и форме. Гепатоциты среднего размера имеют круглоовальную форму с умеренным количеством хроматина, с одним, реже двумя мелкими ядрышками близи кариолемы. Большинство – двухядерные метатические активированные клетки (~30,22 %).

Таким образом, при применении жидкого препарата *Trichoderma* в течение 7 дней после воздействия гепатоксина выявлена тенденция к восстановлению печеночной ткани: дольчатая структура органа восстанавливается; вокруг кровеносных сосудов заметны обширные участки пролиферирующих ярко окрашенных гепатоцитов, имеющих более плотную структуру.

Таким образом, проведенные эксперименты подтвердили экологическую безопасность и перспективность интродукции биопрепаратов на основе штаммов супрессоров рода *Trichoderma* для повышения урожайности кукурузы. Метаболиты *Trichoderma* ингибируют жизнеспособность раковых клеток, многих фитопатогенных грибов и способствует снижению действия пирена на организм мышей, проявляя иммуномодулирующую активность. Таким образом, показана стимулирующая активность метаболитов по отношению к растениям, антибиотическая к фитопатогенным грибам, цитотоксичность к опухолевым клеткам, иммуностимулирующее и регенерирующее действие на организм мышей после интоксикации. Однако требуется дополнительные исследования, необходимые для проверки биологической активности, различных потенциальных механизмов воздействия и снижения затрат данного подхода.

2.5. Влияние метаболитов на растения в опытах *in vitro* и *in vivo*

2.5.1. Влияние метаболитов на растения в опытах *in vitro* (фитотоксичность) *T. asperellum*, *T. harzianum* и *Aspergillus awamori* относительно проростков кукурузы.

Обработка семян культуральной жидкостью *T. asperellum* и *T. harzianum* достоверно ($p \downarrow 0,05$) увеличивала длину проростков и их корней после 168 часов инкубации при 28°C на 40% и 60% соответственно относительно контроля. Наблюдалась достоверная разница ($p \downarrow 0,05$) между сортами кукурузы и максимальный эффект обработки фильтратом был показан для сорта Гиза балади (рис. 15А,Б). Таким образом, можно заключить, что *T. asperellum* и *T. harzianum* оказывают одинаковое действие на проростки кукурузы – увеличивают их длину.

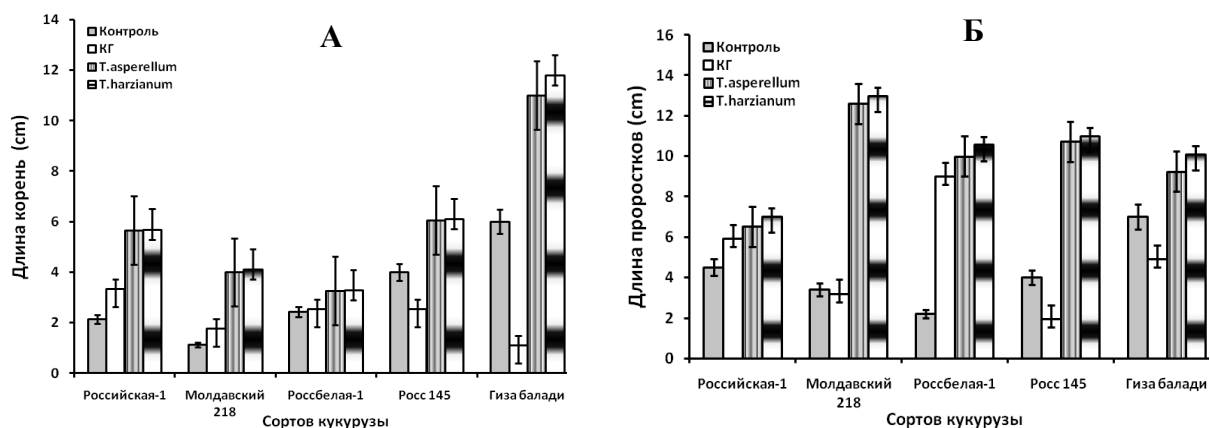
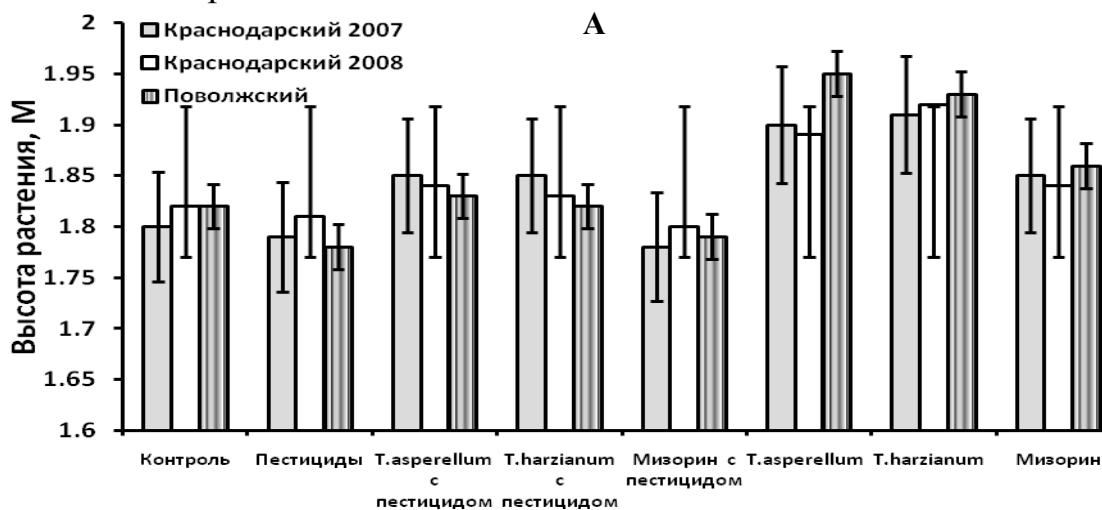


Рис.15. Влияние культурального фильтрата *T.asperellum* 551 и *T. harzianum* 3 на длину корней (А) и проростков (Б) кукурузы.

Также наблюдалось влияние метаболитов *Trichoderma* на высоту растений (Рис.16А) и количество початков (Рис. 16Б) кукурузы. Обработка зёрен кукурузы перед посадкой культуральной жидкостью *T. asperellum*, *T. harzianum*, Мизорином и культуральной жидкостью *Trichoderma* с пестицидом привела к увеличению роста растений на 10%, 9%, 3 и 4% соответственно по отношению к контролю и независимо от сорта кукурузы. На основе полученных данных можно заключить, что наилучшей стимулирующей рост растений способностью обладает КЖ *T. asperellum* и *T. harzianum*. Кроме того, результаты показали, что число початков колебалось в диапазоне от 2 до 4 во всех экспериментальных и контрольных вариантах (Рис.14Б), но наибольшее число початков наблюдалось при обработке культуральным фильтратом *T.asperellum* 551 и *T. harzianum* по сравнению с контролем.



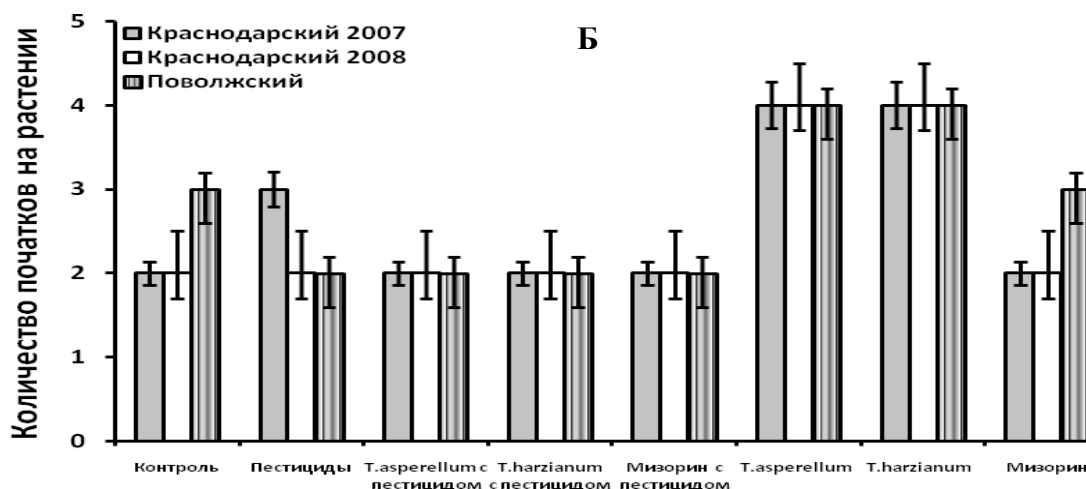


Рис.16. Влияние биопрепаратов на высоту растений (А) и количество початков (Б) кукурузы.

Таким образом, метаболиты *T. asperellum* и *T. harzianum* способствуют увеличению урожайности кукурузы, что, вероятно, обусловлено высокой конкурентной активностью использованных в работе штаммов *Trichoderma*.

Выводы

- 1-По морфолого-кинетическим и электрокинетическим параметрам установлена антибиотическая активность *Trichoderma* в отношении патогенных видов *F. oxysporum*, *A. awamori*, *A. flavus*. Наибольшая эффективность в подавлении *F. oxysporum* выявлена у *T. asperellum* 551 из почв РТ.
- 2-Определена зависимость токсинообразования плесневым грибом *A. flavus* от вида антагониста при совместном культивировании. *T. asperellum* 551 из почв РТ стимулирует синтез ократоксина А и полностью ингибирует синтез афлатоксина, а *T. harzianum* 3 из почв Египта стимулирует продукцию ократоксина А и афлатоксина В1.
- 3-Выявлен дозозависимый эффект амфотерицина на *A. awamori*. Фунгицидное действие метаболитов *Trichoderma* сопоставимо с действием высоких доз амфотерицина.
- 4-Метаболиты *T.asperellum* 551 и *T. harzianum* 3 оказывают цитотоксическое действие на опухолевые клетки линии HeLa в опытах *in vitro*. Наибольшая эффективность подавления выявлена у *T.asperellum* 551 из почв РТ.
- 5-Установлено, что метаболиты *T.asperellum* 551 не вызывают опухолеобразование и нивелирует токсическое действие пирена по восстановлению тканей, нормализации обмена веществ, комплексу биохимических показателей и восстановлению иммунной системы.
- 6-Метаболиты *T.asperellum* 551 и *T. harzianum* 3 не фитотоксичны, увеличивают урожайность кукурузы. Наибольшая биологическая активность показана на сорте Гиза баладе из Египта.

Публикации по теме диссертации в изданиях рекомендованных ВАК

1. **Абдельрахман А.А.**, Козлова О.В., Тазетдинова Д.И., Алимова Ф.К., Куприянова-Ашина Ф.Г. Изменения роста *Aspergillus awamori* и содержание внутриклеточного кальция в ответ на воздействие амфотерицина / Учёные записки Казанского Университета.- 2011.- Т.153.- Книга 1.- С.97-110.
2. Сахабиев И.А., Рябичко С.С., Иванова В.В., **Абдельрахман А.А.**, Григорьян Б.Р., Алимова Ф.К. Мониторинг микромицетов выщелоченного чернозема агроценозов Черемшанского района Республики Татарстан / Учёные записки Казанского Университета.- 2011.- Т.153.- Книга 2.- С.250-261.
3. Хоанг Л.Т., **Абдельрахман А.А.**, Иванова В.В., Тхи Т.Н., Рябичко С.С., Фаттахова А.Н., Алимова Ф.К. Биологическая активность жидкого препарата *Trichoderma* в опытах *in vitro* и *in vivo* / Журнал "Фундаментальные исследования".-2011.-№ 11.-часть 2. (в печати).

Другие публикации по теме диссертации

1. **Абдельрахман А.А.**, Тазетдинова Д.И., Алимова Ф.К., КуприяноваАшина Ф.Г. влияние амфотерицина В на рост *Aspergillus awamori*. Материалы научнопрактической конференции становление и достижения биохимической школы Казанского университета Научнопрактическая конференция биохимиков, посвященная памяти проф. В.Г. Винтера (1939-2005) 12 ноября 2009. С.9
2. Козлова О.В., **Абдельрахман А.А.**, Тазетдинова Д.И., КуприяноваАшина Ф.Г., Алимова Ф.К. Влияние противогрибковых препаратов на уровень кальция в цитозоле *Aspergillus awamori* Материалы научнопрактической конференции Становление и достижения биохимической школы Казанского университета Научнопрактическая конференция биохимиков, посвященная памяти проф. В.Г. Винтера (1939-2005) 12 ноября 2009. с. 67.
3. **Абдельрахман А.А.**, Тазетдинова Д.И., Алимова Ф.К., Куприянова-Ашина Ф.Г. Влияние амфотерицина В на рост микромицетов рода *Aspergillus* материалы всероссийского симпозиума с международным участием, современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов, Московский государственный университет, биологический факультет 24-27 декабря 2009. с.13
4. Козлова О.В., Куприянова-Ашина Ф.Г., Алимова Ф.К., **Абдельрахман А.А.**, Тазетдинова Д.И. Влияние противогрибковых препаратов на уровень кальция в цитозоле *Aspergillus awamori* методом рекомбинантного экворина материалы всероссийского симпозиума с международным участием, современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов, Московский государственный университет, биологический факультет 24-27 декабря 2009. с.81
5. **Абдельрахман А.А.**, Козлова О.В., Тазетдинова Д.И., Алимова Ф.К., Куприянова-Ашина Ф.Г. Изменения роста *Aspergillus awamori* и содержание внутриклеточного кальция в ответ на воздействие амфотерицина / Сборник

- трудов I Всероссийской Интернет-конференции "Современные проблемы биохимии и бионанотехнологии" 17-22.11.2010. Казанский Университет С.4-7.
6. **Абдельрахман А.А.**, Эльшафей С.М.А., Рябичко С.С., Иванова В.В., Морозова Ю.А., Алимova Ф.К. Влияние *Trichoderma* почв Египта и Республики Татарстан на растения, фитопатогены и жизнеспособность линии раковых клеток. / Сборник трудов II Международная конференция: "Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий" 15-18.11.2011. Казанский федеральный Университет
 7. Morozova, J.A.; Pankova, A.V.; Skvortsov, E.V. and **Abd El-Rahman, A.A.** (2009). Screening of micromycetes the genus *Trichoderma* with high xylanase activity. In the proceeding of the 13th annual symposium for Biology Students of Europe (SymBioSE 2009) Biology: Expansion of Borders. Organized by Kazan State University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation, 30 July – 8 August 2009.
 8. **Abd El-Rahman, A.A.**; Sally M.A. El-Shafei; Diana I. Tazetdinova; Reseda I. Tukhbatova; Flaira G. Kuriyanova-Ashina and Farida K. Alimova. Effect of treatment maize grains before planting with *Trichoderma Spp* as bioagents on the yield In the proceeding of the Minia International Conference for Agriculture and Irrigation in the Nile Basin Countries, organized by faculty of agriculture, Minia university, El-Minia, Egypt, 26th -29th March 2012, In press

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н. проф. **Алимовой Ф.К.** за внимательное отношение к работе; д.б.н., проф. **Абрамовой З.И.** за советы в процессе выполнения диссертационной работы; к.б.н., доц. **Фаттаховой А.Н.** за помощь при приведении исследований на животных; д.б.н. проф. **Куприяновой-Ашиной Ф.Г.** за помощь в работе над диссертацией; к.б.н. **Абдуллину Т.И.** за помощь в проведении исследований электрокинетического потенциала конидий микромицетов; к.б.н. **Тазетдиновой Д.И.** и к.б.н. **Тухбатовой Р.И.** за консультации в процессе выполнения работы; **Хоанг Л.Т.** и **Тхи Т.Н.** за помощь при проведении гистологических исследований; **Рябичко С.С.** и **Ивановой В.В.**, **Морозовой Ю.А.** за помощь в работе над диссертацией; д.б.н. проф. **Эльшафей М.А.** и **Эльморсей Э.А.** за ценные идеи в процессе выполнения работы. Автор выражает глубокую благодарность **родителям** за консультации и поощрение в процессе выполнения работы. Благодарность выражается **Салли Эльшафей** за помощь и советы в процессе выполнения работы. Благодарность выражается; аспирантам и студентам лаборатории сельскохозяйственной биохимии и биотехнологии кафедры биохимии.

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: Казань, 420008, ул. Кремлевская, 18, Казанский университет, отдел аспирантуры, Ученому секретарю Диссертационного совета Д212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне. Факс 8(843)238-76-01

E-mail: atefnagi2000@yahoo.com,

Тел: Россия:+79518922596, Египет:+2